

بررسی مقایسه‌ای دو روش (کروماتوگرافی مایع با عملکرد عالی) و (ایمونواسی پلاریزاسیون فلوئورسانس) در بررسی سطح خونی فنوباریتال و کاربامازپین

چکیده

زمینه و هدف: سنجش سطح درمانی داروها (TDM) یک عملکرد بسیار مهم آزمایشگاه بالینی مدرن است. تکنیک‌های کروماتوگرافی از دیرباز به عنوان استاندارد طلایی اندازه‌گیری داروها محسوب می‌گردند. روش‌های ایمونواسی به دلیل قابلیت پیاده شدن روی سیستم‌های خودکار، سرعت بالا و عدم نیاز به پرسنل متخصص، امروزه بسیار مورد استفاده هستند. این مطالعه به منظور مقایسه (ایمونواسی پلاریزاسیون فلوئورسانس) یا FPIA با روش (کروماتوگرافی مایع با عملکرد عالی) یا HPLC در اندازه‌گیری سطح خونی داروهای کاربامازپین و فنوباریتال انجام شده است.

روش بررسی: در این تحقیق مقطعی - تحلیلی ۱۰۰ بیمار مصرف کننده فنوباریتال و ۱۰۳ بیمار مصرف کننده کاربامازپین مراجعه کننده به بخش TDM آزمایشگاه‌های رفرانس ایران مورد نمونه‌گیری قرار گرفتند، سطح خونی دارو در آنها با هر دو روش اندازه‌گیری شد و نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری ضریب همبستگی پیرسون، T-test و آنالیز خطی رگرسیون مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: ضریب همبستگی (r) برای فنوباریتال و کاربامازپین به ترتیب ۰/۹۷۱ و ۰/۹۵۳ بود که نشان دهنده ارتباط آماری معنی‌دار بسیار خوب بین دو روش بود. آنالیز خطی رگرسیون، همچنین T-test نشان دادند که ارزش‌های مربوط به روش FPIA کمی بیشتر از روش HPLC می‌باشند.

نتیجه‌گیری: HPLC و FPIA می‌توانند به عنوان جایگزین در آزمایشگاه بالینی جهت اندازه‌گیری سطح خونی فنوباریتال و کاربامازپین مورد استفاده قرار گیرند. تنها در موارد خاص که نیاز به دقت بالا دارد و نیز مطالعات تحقیقاتی در HPLC، TDM می‌تواند مفیدتر باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱ - سنجش سطح درمانی داروها

۲ - ایمونواسی پلاریزاسیون فلوئورسانس

۳ - کروماتوگرافی مایع با عملکرد عالی ۴ - فنوباریتال ۵ - کاربامازپین

*دکتر بیتا بهرامیان I

دکتر علیرضا صادقی پور II

دکتر حرمت‌زمان درویش‌علی III

تاریخ دریافت: ۸۳/۹/۸، تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۲۶

مقدمه

سنجش سطح درمانی داروها (Therapeutic Drug Monitoring) یا TDM یک عملکرد بسیار مهم آزمایشگاه بالینی مدرن است که انجام صحیح آن موجب پیشرفت در امر دارو درمانی می‌گردد و بر عکس انجام نادرست آن

(I) دستیار آسیب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران. (*مؤلف مسؤول)

(II) استادیار و متخصص آسیب‌شناسی، بیمارستان حضرت رسول اکرم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.

(III) دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی، آزمایشگاه‌های رفرانس ایران، بخش سنجش دارو.

(بدون اینکه نگران عدم هماهنگی بین آزمایشگاه رفرانس و سایر مراکز جهت اندازه‌گیری سطح خونی داروها باشیم) از این تکنیک به طور وسیع‌تری در آزمایشگاه‌های بالینی کشور استفاده نماییم.

روش بررسی

این مطالعه تحلیلی - مقطعی روی ۲۰۳ بیمار که در فاصله زمانی زمستان سال ۸۲ و فروردین سال ۸۳ (۱۰۰) بیمار مصرف کننده فنوباربیتال و ۱۰۳ بیمار مصرف کننده کاربامازپین (جهت اندازه‌گیری سطح خونی دارو به بخش سنجش داروی آزمایشگاه‌های رفرانس ایران مراجعه کرده بودند، صورت گرفت. بیماران پس از ثبت نام، تحت خون‌گیری قرار می‌گرفتند، از هر بیمار ۵cc خون گرفته می‌شد و سرم بیمار جدا می‌گردید. جهت اندازه‌گیری دارو توسط دستگاه HPLC، ابتدا دارو باید استخراج می‌شد به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سرم بیمار را در لوله سانتریفوژ محتوی ۲۵۰ میکرولیتر "استونیتیل" (Aceto nitrile) همراه با ۲۵ میکرولیتر محلول استاندارد داخلی بوتوباربیتال وارد و ورتکس (Vortex) می‌کردیم، سپس آن را به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰ RPM، سانتریفوژ می‌نمودیم. ۲۰ میکرولیتر از محلول صاف شده استخراج یافته بالایی، آماده تزریق به دستگاه بود. (دستگاه HPLC ۱۱۰۰ ساخت کارخانه Cecil).

پس از تزریق، طی مدت زمان ۱۰-۵ دقیقه دارو بر اساس زمان بازپایی مشخص خود که متناسب با میل ترکیبی آن با ستون (فاز ثابت) می‌باشد، به صورت پیک (Peak) روی صفحه کامپیوتر دستگاه نمایان می‌شد. سطح زیر پیک محاسبه می‌گردید، هم برای دارو و هم برای استاندارد داخلی که با تقسیم این دو عدد بر هم فاکتوری به دست می‌آمد که دستگاه براساس آن به طور خودکار میزان دارو را بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه و اعلام می‌نمود. جهت اندازه‌گیری دارو با روش FPJA نیز از دستگاه TDX ساخت کارخانه Abott استفاده می‌شد که داخل Cartridge های دستگاه ۱۰۰ میکرولیتر سرم و نیز ۱۰۰

هزینه‌های آزمایشگاهی و درمانی را بدون کمک به امر درمان، افزایش می‌دهد.^(۱) یکی از مهم‌ترین گروه‌های دارویی که نیاز به اندازه‌گیری مرتب دارند، داروهای ضد صرع (Anti epileptic) می‌باشند. صرع بیماری شایعی است، شیوع جهانی آن تقریباً ۸/۰-۷/۰ درصد و میزان وقوع موارد جدید (Incidence) آن ۵/۰ درصد می‌باشد. کاربامازپین (CBZ) و فنوباربیتال (PHE) به عنوان داروهای مقام اول برای کاهش وقوع و شدت صرع به کار می‌روند.^(۲)

روش‌های کروماتوگرافیک به عنوان "استاندارد طلایی" در اندازه‌گیری کمی داروها محسوب می‌گردند.^(۳) امروزه "کروماتوگرافی مایع با عملکرد عالی" یا (HPLC= High Performance Liquid Chromatography) به دلیل حساسیت و ویژگی بالای آن بسیار مورد توجه است.^(۴) روش‌های ایمنواسی نیز امروزه به طور وسیعی به کار می‌روند که در واقع برای اندازه‌گیری سطح دارو از روش‌های ایمنولوژیک بهره می‌برند.^(۵)

ایمنواسی پلاریزاسیون فلورسانس (Fluorescence Polarization Immunoassay) (FPJA) نیز یکی از انواع سنجش‌ها است که روشی بسیار حساس و ظریف می‌باشد و امروزه کاربرد وسیعی پیدا کرده است.^(۶) HPLC روشی دقیق است ولی در عین حال با توجه به گرانی دستگاه، نیاز به پرسنل با تجربه و کارآموده برای پیاده کردن تکنیک مناسب برای آن و نیز زمان طولانی‌تر برای انجام آزمایش، قابل دسترسی برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها خصوصاً در شهرستان‌های کوچک نمی‌باشد، در مقابل FPJA روشی است که روی سیستم‌های خودکار قابل پیاده شدن است، سرعت آن بالا بوده و در موارد اندازه‌گیری اورژانسی سطح داروها، کارایی بالایی دارد، همچنین قابلیت بهره برداری از آن در آزمایشگاه‌های کم‌تر تخصصی نیز وجود دارد.

هدف کلی این مطالعه که با همکاری بخش TDM آزمایشگاه‌های رفرانس ایران انجام شده است، مقایسه نتایج حاصله از روش FPJA با روش HPLC در اندازه‌گیری سطح خونی داروهای فنوباربیتال و کاربامازپین بوده است که در صورت عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری، بتوان

HPLC و FPIA پرداخته شد که ارتباط معنی‌دار مستقیم آماری وجود دارد ($r=0/971$ و $P=0/000$). همچنین با استفاده از آنالیز رگرسیون، ارتباط خطی بین روش FPIA و HPLC دیده شد ($r=0/971$ ، $y_0=1/94$ ، $Slope=0/99$ ، $SEE=4/008$).

جدول شماره ۱- مقایسه شاخص آماری سطح سرمی کاربامازپین با

FPIA و HPLC دو روش		روش	سطح سرمی دارو
FPIA	HPLC		
۷/۵۹	۶/۸۴	میانگین	
۷/۴	۶/۶	میانه	
۷/۲	۴/۵	نما (Mode)	
۲/۴۵	۲/۶۱	انحراف از میانگین (Standard Deviation)	
۱۲/۱	۱۲/۳	دامنه (Range)	
۲/۲	۱/۷	حداقل (Minimum)	
۱۴/۳	۱۴	حداکثر (Maximum)	

جدول شماره ۲- مقایسه شاخص‌های آماری سطح سرمی

FPIA و HPLC فنوباربیتال با دو روش		روش	سطح سرمی دارو
FPIA	HPLC		
۲۹/۴۹	۲۷/۶۶	میانگین	
۲۷/۶۵	۲۶	میانه	
۳۲	۳۰	نما (Mode)	
۱۶/۵۴	۱۶/۱۲	انحراف از میانگین (Standard Deviation)	
۷۶/۹۰	۷۸/۳۰	دامنه (Range)	
۰/۱۰	۰/۷۰	حداقل (Minimum)	
۷۷	۷۹	حداکثر (Maximum)	

این یافته‌ها حاکی از این است که مقادیر اندازه‌گیری شده با روش FPIA نسبت به HPLC کمی بالاتر هستند (جدول شماره ۳، نمودار شماره ۱). به همین ترتیب با استفاده از آزمون همبستگی و ضریب همبستگی پیرسون به بررسی ارتباط سطح سرمی کاربامازپین با دو روش HPLC و FPIA پرداخته شد که ارتباط مستقیم معنی‌دار آماری وجود دارد ($r=0/953$ و $p=0/000$).

با استفاده از آنالیز رگرسیون نیز ارتباط خطی بین سیستم FPIA و HPLC دیده شد ($r=0/953$ ، $y_0=1/47$ ، $Slope=0/89$ ، $SEE=0/47$). این یافته‌ها حاکی از این است که

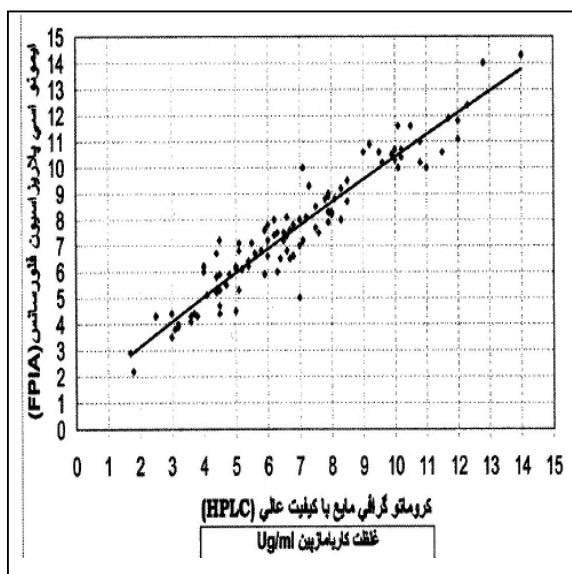
میکرولیتر سرم کنترل می‌ریختیم، کیت را در محل مخصوص آن در دستگاه قرار می‌دادیم، دستگاه را قفل کرده و سپس روشن می‌نمودیم، دستگاه با آنالیز خودکار غلظت سرمی دارو را اعلام می‌کرد. قبل از شروع کار پژوهش، دستگاه‌ها کالیبر شده و دقت روش‌ها با اندازه‌گیری‌های مکرر سه غلظت بالا، متوسط و پایین داروهای کنترل بررسی شد. CVهای به دست آمده در این روش‌ها در هر سه غلظت در محدوده ۵/۱-۹/۶ بود که قابل مقایسه با متدهای ثابت ارائه شده پیشین می‌باشد.^(۵)

محدوده قابل اندازه‌گیری با هر دو روش برای کاربامازپین ۲۰-۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای فنوباربیتال ۸۰-۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. محدوده درمانی کاربامازپین ۱۲-۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و فنوباربیتال ۴۰-۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS۱۰ (Pearson Correlation Coefficient)، T-test و آنالیز خطی رگرسیون مورد بررسی قرار گرفتند. در این پژوهش شرکت یا عدم شرکت بیماران در مطالعه اثری بر نحوه ارائه خدمات درمانی نداشت و هزینه‌ای نیز به بیماران تحمیل نمی‌شد.

یافته‌ها

به طور کلی در این مطالعه ۱۰۰ بیمار مصرف کننده فنوباربیتال و ۱۰۳ بیمار مصرف کننده کاربامازپین مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سطح سطحی کاربامازپین با روش HPLC و FPIA به ترتیب ۶/۸۳ و ۷/۵۹ بود. دامنه تغییرات با این روش‌ها به ترتیب ۱۲/۳ و ۱۲/۱ محاسبه گردید. همچنین میانگین سطح سرمی فنوباربیتال با دو روش HPLC و FPIA به ترتیب ۲۷/۶۶ و ۲۹/۴۹ بود. دامنه تغییرات با روش HPLC، ۷۸/۳۰ و با روش FPIA، ۷۶/۹۰ محاسبه شد (جدول شماره ۱ و ۲).

با استفاده از آزمون همبستگی و ضریب همبستگی پیرسون به بررسی ارتباط سطح سرمی فنوباربیتال با دو روش



نمودار شماره ۲- مقایسه سطوح کاربامازپین اندازه‌گیری شده با دو روش

FPIA و HPLC

جدول شماره ۳- نتایج آنالیز رگرسیون

تعداد	ضریب همبستگی	خطای استاندارد پیش‌بینی شده	y_0 (intercept)	شیب	مقایسه
۱۰۰	۰/۹۷۱	۴/۰۰۸	۱/۹۴	۰/۹۹	فنوباریتال: VS.HPLC(x), FPIA(y)
۱۰۳	۰/۹۵۳	۰/۴۷	۱/۴۷	۰/۸۹	کاربامازپین: VS.HPLC(x), FPIA(y)
۱۷	۰/۹۴۶	۶/۳۹	۴/۴	۰/۹۶	فنوباریتال < ۴۰ (Ug/ml) HPLC(x)-FPIA(y)
۷۸	۰/۸۹۰	۳/۲۲	۱/۵۶	۱/۰۱	فنوباریتال > ۴۰ (Ug/ml) HPLC(x)-FPIA(y)
۲۷	۰/۸۶۶	۰/۶۷	۲/۷۸	۰/۷۷	کاربامازپین < ۸ (Ug/ml) HPLC(x)-FPIA(y)
۶۴	۰/۸۵۳	۰/۷۳	۱/۷۳	۰/۸۲	کاربامازپین > ۸ (Ug/ml) HPLC(x)-FPIA(y)

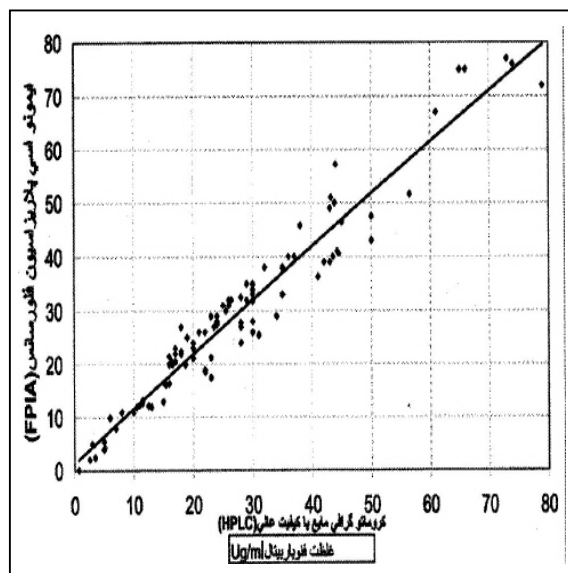
SEE: Standard error of estimate, r: Correlation coefficient (ضریب همبستگی), $P < 0.05$

FPIA: ایمنونواسی پلاریزاسیون فلورسانس, HPLC: کروماتوگرافی مایع با عملکرد عالی

بحث

در این پژوهش ارتباط مستقیم معنی‌دار آماری بین دو روش FPIA و HPLC در بررسی سطح خونی فنوباریتال و کاربامازپین به دست آمد. با توجه به این که در هر دو مورد $r > 0.95$ است می‌توان گفت همبستگی خوبی بین دو روش وجود دارد. در سال ۱۹۷۹ مطالعه‌ای توسط جامعه شیمی بالینی آمریکا به منظور مقایسه روش FPIA با روش‌های EMIT و Gas chromatography جهت اندازه‌گیری سطح خونی فنی‌توئین به عمل آمد که هر سه متد تطابق بالایی داشتند.^(۶)

در سال ۱۹۸۸ مطالعه دیگری در دپارتمان پاتولوژی Baltimore انجام شد که طی آن تکنیک FPIA با متد مرجع GC مورد مقایسه قرار گرفت که در تمام موارد $r > 0.97$ بود



نمودار شماره ۱- مقایسه سطوح فنوباریتال اندازه‌گیری شده با دو روش

FPIA و HPLC

منابع

- 1- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz fundamental of clinical chemistry. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001. p: 608-635.
 - 2- Domingue AM, Peiro ME, Agusti MG, Tomas JM, Romero JE. Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum sample. Clinical chemistry; 2002. 48: 1696-1701.
 - 3- Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 12th ed. Philadelphia: WB sunders; 2001. p: 336-351.
 - 4- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz text book of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B sunders; 1999. P: 871-872.
 - 5- Warner A, Privitera M, Bates D. Standards of laboratory practice, antiepileptic drug monitoring. Clinical chemistry; 1998. 44(5): 1085-1095.
 - 6- Rc Woog, JF Burd, RJ carrico, RT Buckler, J Thomas, RC Boguslaski. Substrate-labeled fluorescent immunoassay for phenyion in human serum. Clinical chemistry; 1979. 25: 686-691.
 - 7- Caplan TH, Levine B. Application of the abbolt TDX lidocaine, phenyion and phenobarbital assays to portmortem blood specimens. Anal Toxicol J; 1988. 12(5): 265-7.
 - 8- B. Rambeck, T.W. May, U. Jurgens, V. Blankenhorn, U. Jurges, E. Korn-Merker, et al. Comparison of phenyion and carbamazepine serum concentrations measured by High-performance liquid chromatography, the standard TDX Assay, the Enzyme multiplied Immunoassay technique and a new patient-side Immunoassay cartridge system. Therapeutic Drug Monitoring; 1994. 16: 6085-612.
 - 9- MA Jon, ZHU Peng-ling, XIE Jing-wen, JIA zheng-ping, Yang jin-sheng. Restricted-access media high pressure liquid chromatography vs fluorescence polarization immunoassay for analysis of carbamazepine in human plasma. Acta pharmacol sin; 2002. 23(1): 87-91.
- و تطابق بالایی بین دو روش گزارش شد.^(۷) در سال ۱۹۹۴ در دپارتمان بیوشیمی مرکز اپی‌لپسی "Bethel" در کشور آلمان، مطالعه‌ای به منظور مقایسه تکنیک‌های HPLC، EMIT و FPIA با یک سیستم Immunoassay بنام "Biotrack" روی بیماران مصرف کننده فنی‌توئین و کاربامازپین انجام شد که r از ۰/۹۳۱ تا ۰/۹۸۵ متغیر بود.^(۸) در سال ۲۰۰۲ در کشور چین در دپارتمان داروسازی بیمارستان Lanzhou به منظور مقایسه نوعی سیستم HPLC با متد FPIA جهت اندازه‌گیری کاربامازپین پلاسمای بیماران مبتلا به صرع به عمل آمده است که $r=0/989$ بود. در ضمن بررسی با روش آماری T-test نشان داده است که نتایج FPIA بالاتر از HPLC هستند.^(۹)
- در مطالعه ما نیز در مورد فنوباریتال شیب منحنی (Slope) یا m ، ۰/۹۹ و در مورد کاربامازپین ۰/۸۹ یعنی نزدیک به یک است ولی y_0 به ترتیب ۱/۹۴ و ۱/۴۷ محاسبه شد. با توجه به رابطه $y_0=mx+y$ نتیجه می‌گیریم که ارزش‌های روش جدید (FPIA) کمی بیشتر از روش قدیمی (HPLC) می‌باشد که این مسئله با آزمون Paired T-Test هم تأیید شده است.
- در ضمن در این مطالعه برای داروها سطح مرزی تعیین شد (فنوباریتال ۴۰ و کاربامازپین ۸) و دو روش در سطوح بالا و پایین آن هم مورد مقایسه قرار گرفتند که ارتباط مستقیم آماری به دست آمد ولی r کمتر از ۰/۹۵ بود که نشان می‌دهد با محدود کردن زمینه مطالعه از میزان ارتباط و خطی بودن منحنی رگرسیون کاسته می‌شود.

نتیجه‌گیری

به دلیل همخوانی خوب دو روش، FPIA قابل جایگزینی به جای HPLC می‌باشد. تنها توصیه می‌شود وقتی نیاز به اندازه‌گیری‌های کمی بسیار حساس است مثل طرح‌های پژوهشی - تحقیقاتی که مجبور به کاهش خطا تا حد نزدیک به صفر هستیم، بهتر است همچنان از روش HPLC که روش مرجع است، استفاده شود.

Comparative Evaluation of High Performance Liquid Chromatography(HPLC) & Fluorescent Polarization Immunoassay(FPIA) Methods in Measuring Blood Concentration of Phenobarbital & Carbamazepine

/
*B. Bahramian, MD

//
A. Sadeghipoor, MD

///
H. Darvish Ali, MTD

Abstract

Background & Aim: Therapeutic drug monitoring(TDM) is a very important function of a modern clinical laboratory. Chromatographic techniques have been the gold standard method for quantitative monitoring of drugs from the long time ago. Immunoassay methods are very useful today due to their ability to be installed on automation systems, their high speed and independence from expert personnel. The present study was undertaken to compare high performance liquid chromatography(HPLC) method with fluorescent polarization immunoassay(FPIA) for analysis of carbamazepine(CBZ) and phenobarbital (PHE) level in human blood.

Patients & Methods: In this cross-sectional research 100 patients on PHE and 103 patients on CBZ regimen admitted to TDM center of Iran Reference Laboratories were sampled. Levels of drug in blood were measured. Data were recorded and then analysed by statistical tests of Pearson correlation coefficient(r), linear regression analysis and T-Test.

Results: For PHE and CBZ, r was respectively 0.971 and 0.953, which indicated a good correlation between two methods. Linear analysis of regression and T-Test showed that data sets of FPIA method are a little higher than HPLC.

Conclusion: Both HPLC and FPIA may be applied to determine PHE & CBZ in TDM. HPLC can be more useful in special cases who need high precision and TDM related research.

Key Words: 1) Therapeutic Drug Monitoring(TDM)

2) Fluorescent Polarization Immunoassay(FPIA)

3) High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

4) Phenobarbital(PHE) 5) Carbamazepine(CBZ)

I) Resident of Pathology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)

II) Assistant Professor of Pathology. Hazrat Rasoul Hospital. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

III) MTD in Laboratory Sciences. Iran Reference Laboratory.